

Pemurnian Parsial Enzim Lipase dari Bakteri Isolat Lokal LKMA₃ dan Penentuan Aktivasnya dengan Metode Spektrofotometri

Aiga Sheira Rait¹, Nurhasanah^{1,2*}, Syaiful Bahri²

¹Grup Penelitian Lipase, Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Lampung
Jl. Soemantri Brojonegoro No. 1, Bandar Lampung, 35143, Indonesia

²Staf Dosen Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung
Jl. Soemantri Brojonegoro No. 1, Bandar Lampung, 35143, Indonesia

*Email korespondensi: nur.hasanah@fmipa.unila.ac.id
Dikirim: 25-03-2022, Diterima: 25-04-2022, Diterbitkan: 02-05-2022

Abstrak

Lipase merupakan enzim yang mengkatalisis proses hidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol. Lipase banyak dimanfaatkan dalam bidang industri seperti pangan, farmasi, kosmetik dan deterjen. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan enzim lipase dari bakteri isolat lokal kompos mesofilik (LKMA₃) dengan tingkat kemurnian yang relatif lebih baik terhadap ekstrak kasar. Metode penelitian yang dilakukan meliputi produksi lipase dari bakteri isolat lokal (LKMA₃), pemurnian lipase secara terfraksi menggunakan amonium sulfat dan dialisis. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan substrat *p*-nitrofenil palmitat dan kadar protein dengan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar memiliki aktivitas unit (AU) 298,33 U mL⁻¹ dan kadar protein 0,2226 mg mL⁻¹ dengan nilai aktivitas spesifik (AS) 1340,22 U mg⁻¹. Pemurnian secara terfraksi dengan amonium sulfat diperoleh aktivitas unit enzim tertinggi pada kejenuhan amonium sulfat (20-90%) sebesar 437,83 U mL⁻¹ dan kadar protein 0,2153 mg mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik enzim 2033,59 U mg⁻¹. Pemurnian tahap lanjut dengan dialisis diperoleh aktivitas unit enzim 395 U mL⁻¹ yang menunjukkan adanya peningkatan aktivitas spesifik menjadi 4197,66 U mg⁻¹. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa pemurnian parsial enzim lipase dari bakteri isolat lokal LKMA₃ mampu meningkatkan kemurnian lipase menjadi 3,13 kali dibandingkan ekstrak kasar.

Kata kunci: lipase; *p*-nitrofenil palmitat; pemurnian; spektrofotometri

Abstract

Lipase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of triacylglycerol into fatty acids and glycerol. Lipase is widely used in various industries such as food, pharmaceuticals, cosmetics, and detergents. This study aims to obtain lipase from local isolate LKMA₃ bacteria with relatively better purity levels than crude extracts. The research method used include lipase production from local isolates of mesophilic compost (LKMA₃) bacteria, fractional purification using ammonium sulfate, and dialysis. Measurement of enzyme activity was carried out by spectrophotometric method using *p*-nitrophenyl palmitate as substrate and protein content by Lowry method. The results showed that the crude extract of the local isolates LKMA₃ bacteria has a unit activity (UA) 298.33 U mL⁻¹ and protein content of 0.2226 mg mL⁻¹ with a specific activity (SA) 1340.22 U mg⁻¹. Fractional purification with ammonium sulfate obtained the highest enzyme activity at saturation of ammonium sulfate (20-90%) of 437.83 U mL⁻¹ and protein content of 0.2153 mg mL⁻¹ with a specific enzyme activity 2033.59 U mg⁻¹. The further purifications process by dialysis obtained the activity enzyme of 395 U mL⁻¹ and protein content 0.0941 mg mL⁻¹ which indicated an increase in specific activity to 4197.66 U mg⁻¹. Based on these results, it can be concluded that the partial purification of lipase from local isolate LKMA₃ bacteria was able to increase the purity of lipase to 3.13 times compared to crude extract.

Keywords: lipase; *p*-nitrophenyl palmitate; purification; spectrophotometric

1. Pendahuluan

Lipase (*triacylglycerol acylhydrolase*, E.C. 3.1.1.3) merupakan enzim yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserol menjadi asam lemak dan gliserol [1]. Lipase diisolasi dari berbagai hewan, tumbuhan,

bakteri, fungi dan jamur. Mikroorganisme merupakan sumber lipase yang banyak digunakan dalam bidang industri salah satunya teknologi pangan seperti pengolahan susu, pembuatan keju, pembuatan mentega. Selain itu, lipase juga dimanfaatkan dalam bidang industri lain seperti farmasi, kosmetik deterjen, dan sintesis ester [2].

Penentuan aktivitas pada kondisi optimum lipase dilakukan dengan pengukuran aktivitas enzimatis pada variasi temperatur dan pH sehingga akan diketahui aktivitas lipase di setiap rentang temperatur dan pH yang ditentukan [3]. Metode yang digunakan untuk memperkirakan aktivitas lipase secara kuantitatif adalah metode potensiometri, kromatografi, konduktometri, titrimetri, spektrofotometri. Pada metode spektrofotometri, suatu berkas radiasi elektromagnetik apabila dilewatkan melalui suatu zat kimia maka sebagian dari radiasi elektromagnetik tersebut akan diserap. Molekul dalam zat tersebut akan menyerap radiasi elektromagnetik pada daerah panjang gelombang tertentu [4].

Pada penelitian ini, uji aktivitas lipase menggunakan substrat *p-nitrophenol palmitate*. Aktivitas lipase diukur berdasarkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang 410 nm yang menunjukkan pelepasan senyawa *p-nitrophenol* dari substrat *p-nitrophenol palmitate* [5]. Uji kadar protein menggunakan metode Lowry didasarkan pada kombinasi antara pereaksi biuret dengan pereaksi lain (Folin-Ciocalteu) yang bereaksi dengan residu tyrosine dan tryptophan dalam protein. Reaksi yang terjadi menghasilkan warna kebiruan yang terbaca pada panjang gelombang 500-750 nm [6].

Bakteri isolat lokal LKMA₃ merupakan isolat yang diperoleh dari fase mesofilik proses pengomposan limbah domestik dengan suhu pengomposan 37°C. Penelitian terhadap bakteri isolat LKMA₃ dengan metode titimetri telah dilaporkan bahwa ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas sebesar 15 U mL⁻¹ dan meningkat menjadi 17,33 U mL⁻¹ setelah tahap pemurnian dengan fraksinasi dan dialisis. Enzim lipase dari bakteri isolat lokal LKMA₃ memiliki aktivitas optimum pada pH 5 dengan suhu inkubasi 30°C [7]. Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini dilakukan pemurnian parsial enzim lipase dari bakteri isolat lokal LKMA₃ dengan metode spektrofotometri untuk mendapatkan enzim lipase dengan tingkat kemurnian yang relatif lebih baik terhadap ekstrak kasar.

2. Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, gelas beaker, erlenmeyer, *autoclave*, *shaker incubator*, *magnetic stirrer*, *vortex*, alat sentrifus, *Laminar Air Flow* (LAF), pH meter dan spektrofotometer UV-Vis. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri lipolitik LKMA₃, *Nutrient Broth* (NB), minyak kelapa sawit, Na₂CO₃, NaOH, CuSO₄.5H₂O, Na(K)-tartarat, reagen *Folin-ciocalteu*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), aquades, tween 80, minyak zaitun, *buffer* fosfat pH 5, (NH₄)₂SO₄, aseton, etanol, dan *p-nitrofenil palmitat*.

2.2 Prosedur Kerja

2.2.1 Pembuatan Media

2.2.1.1 Media Agar Miring

Media agar miring digunakan untuk meremajakan bakteri isolat lokal LKMA₃ yang disiapkan dengan cara menimbang 1,4 g NA dilarutkan dalam 50 mL aquades dan dipanaskan hingga larut. Kemudian, dituangkan ke tabung reaksi ¼ bagian dan ditutup dengan sumbat. Media agar miring ditaruh pada wadah Erlenmeyer yang telah berisi air dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya, media disimpan dalam posisi miring dan didiamkan hingga agar mengeras.

2.2.1.2 Media Kultur

Media cair yang digunakan sebagai *starter* dan kultur disiapkan dengan cara menimbang 1,3 g NB dilarutkan dalam 100 mL aquades ditambahkan 2 tetes tween 80 dan 2 mL minyak zaitun. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

2.2.2 Produksi Enzim Lipase

Bakteri isolat lokal LKMA₃ sebanyak 2 ose ditumbuhkan pada 20 mL media *starter*. Kemudian, media *starter* diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam. Selanjutnya, *starter* sebanyak 2% dipindahkan ke 1000 mL media kultur dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 18 jam pada pH 5 dan konsentrasi induser (minyak

kelapa sawit) 10%. Setelah proses inkubasi selesai, media kultur yang telah berisi bakteri disentrifugasi dengan selama 15 menit [7]. Kemudian, ekstrak kasar ditentukan aktivitas dan kadar protein enzim.

2.2.3 Pemurnian Enzim Lipase

2.2.3.1 Fraksinasi Amonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim lipase dimurnikan dengan fraksinasi bertingkat menggunakan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-20%, 20%-40%, 40-60%, 60-80% dan 80-100%. Fraksinasi dengan amonium sulfat dilakukan dengan cara menambahkan amonium sulfat sedikit demi sedikit ke dalam larutan ekstrak kasar enzim dalam erlenmeyer sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setiap endapan protein enzim yang didapat lalu dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi selama 15 menit. Kemudian, endapan dibilas dengan larutan *buffer* fosfat 0,25 M pH 5 [7]. Kemudian, ditentukan aktivitas dan kadar protein enzim.

2.2.3.2 Dialisis

Enzim yang telah dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat dilanjutkan ke tahap dialisis dengan cara dimasukkan ke dalam kantong selofan, lalu kantong selofan tersebut dimasukkan dalam wadah yang berisi *buffer* fosfat 0,1 M pH 5 dan diletakkan diatas *magnetic stirrer* dalam keadaan dingin. Selama dialisis, dilakukan pergantian *buffer* setiap 4 jam selama 24 jam [8]. Kemudian, ditentukan aktivitas dan kadar protein enzim.

3. Hasil dan Pembahasan

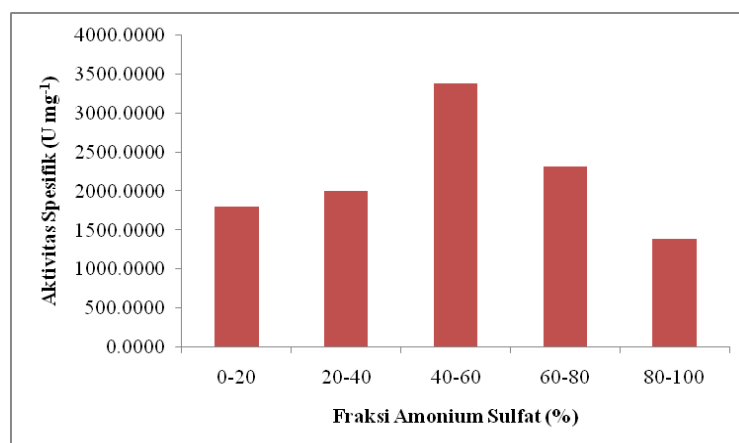
3.1. Produksi Enzim Lipase

Produksi enzim lipase bertujuan untuk memproduksi enzim lipase dalam jumlah besar yang digunakan untuk tahap pemurnian fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis. Pada tahap produksi enzim digunakan pH, suhu dan penambahan inducer dalam kondisi optimum. Hasil yang diperoleh berupa ekstrak kasar enzim yang memiliki aktivitas unit enzim 298,33 U mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik enzim sebesar 1340,22 U mg⁻¹.

3.2. Pemurnian Enzim Lipase

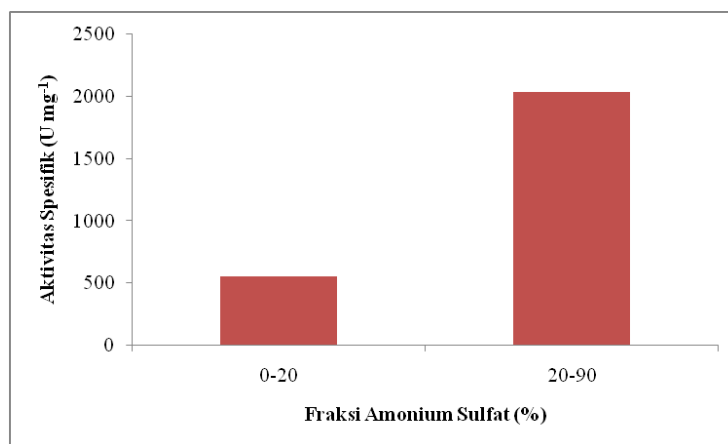
3.2.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Fraksinasi dengan amonium sulfat merupakan pemurnian tahap pertama yang didasarkan pada perbedaan kelarutan enzim yang dilakukan dengan cara menambahkan garam amonium sulfat secara bertahap disertai pengadukan dengan stirrer untuk menghomogenkan amonium sulfat pada ekstrak kasar enzim. Penambahan garam pada konsentrasi tertentu akan mempengaruhi kelarutan protein dalam larutan. Protein yang bersifat hidrofobik akan mengendap pada konsentrasi garam yang rendah sedangkan protein yang bersifat hidrofilik akan mengendap pada konsentrasi garam yang tinggi [9]. Pada fraksi 0-20% didapatkan aktivitas unit enzim 164,67 U mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 1811,51 U mg⁻¹, fraksi 20-40% sebesar 203,50 U mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 2010,87 U mg⁻¹, fraksi 40-60% sebesar 351,50 U mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 3389,58 U mg⁻¹, fraksi 60-80% sebesar 321,17 U mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 2320,57 U mg⁻¹ dan fraksi 80-100% sebesar 181,83 U mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik sebesar 1395,49 U mg⁻¹. Aktivitas spesifik enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan antara Kejenuhan Amonium Sulfat (0-100%) dengan Aktivitas Spesifik Enzim Lipase dari Bakteri Isolat Lokal LKMA₃

Berdasarkan Gambar 1, enzim lipase memiliki aktivitas unit enzim tertinggi pada fraksi 40-60%, yaitu sebesar 351,50 U mL⁻¹ dengan aktivitas spesifik enzim sebesar 3389,58 U mg⁻¹. Pada fraksi 20-40%, 40-60% dan 80-100% masih terdapat enzim lipase yang terendapkan sehingga proses fraksinasi selanjutnya dibagi menjadi 2 tahap yaitu fraksi 0-20% dan 20-90% yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan antara Kejenuhan Fraksi 0-20% Dan 20-90% dengan Aktivitas Spesifik Enzim Lipase dari Bakteri Isolat Lokal LKMA₃

Pembagian fraksi menjadi 2 tahap bertujuan agar didapatkan enzim lipase yang terendapkan secara maksimal dan menghilangkan protein enzim lain selama proses fraksinasi berlangsung. Berdasarkan Gambar 2, aktivitas spesifik enzim lipase dari isolat bakteri LKMA₃ pada tahap fraksinasi dengan tingkat kejenuhan 20-90% meningkat 1,52 kali yaitu sebesar 2033,59 U mg⁻¹ dibandingkan ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik sebesar 1340,22 U mg⁻¹. Adanya peningkatan aktivitas lipase setelah tahap pemurnian dengan amonium sulfat juga telah dilaporkan, diantaranya lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan waktu inkubasi 48 jam dengan suhu 37°C pada tahap fraksinasi dengan tingkat kejenuhan 20-90% meningkat 5,6 kali yaitu sebesar 315,74 U mg⁻¹ dibandingkan dengan ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik 56,25 U mg⁻¹ [10].

3.2.2 Dialisis

Tahap pemurnian selanjutnya adalah dialisis. Dialisis dilakukan untuk menghilangkan molekul garam amonium sulfat yang berpengaruh terhadap kestabilan enzim, dimana molekul garam akan melewati pori-pori semipermeabel dan keluar dari kantong selofan [11]. Kantong selofan yang berisi larutan enzim direndam dalam *buffer* fosfat 0,1 M pH 5 dan diaduk menggunakan *stirrer* pada suhu rendah (4°C) selama 24 jam. Pergantian *buffer* dilakukan setiap 4 sekali sampai semua garam terpisah [12]. Pemurnian enzim lipase dari isolat bakteri LKMA₃ ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pemurnian Enzim Lipase dari Isolat Bakteri LKMA₃

Tahap	Volum Enzim (mL)	Aktivitas Unit (U mL ⁻¹)	Kadar Protein (mg mL ⁻¹)	Aktivitas Spesifik (U mg ⁻¹)	Aktivitas Total (U)	Kemurnian (kali)
Ekstrak Kasar	1000	298,33	0,23	1340,22	298330	1
Fraksinasi	55	437,83	0,21	2033,59	4816,66	1,52
Dialisis	72	395,00	0,09	4197,66	59250	3,13

Berdasarkan data pada Tabel 1, aktivitas spesifik enzim pada tahap dialisis meningkat 3,13 kali yaitu sebesar 4197,66 U mg⁻¹ dibandingkan ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik sebesar 1340,22 U mg⁻¹. Volum enzim yang semula 55 mL mengalami peningkatan menjadi 72 mL pada tahap pemurnian secara dialisis. Tahap pemurnian secara dialisis akan meningkatkan volum larutan enzim [13]. Peningkatan volum ini dikarenakan enzim yang semula dipekatkan dengan amonium sulfat mengalami pengenceran karena molekul garam berdifusi keluar kantong selofan dan ion *buffer* masuk ke dalam kantong selofan. Penelitian mengenai lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada tahap fraksinasi dengan volum enzim 25 mL mengalami peningkatan volum menjadi 33 mL dan aktivitas spesifik meningkat 9,2 kali yaitu sebesar 520 U mg⁻¹ dibandingkan ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik 56,25 U mg⁻¹ [10].

4. Kesimpulan

Ekstrak kasar yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 1340,22 U mg⁻¹ mengalami peningkatan aktivitas spesifik menjadi 4197,66 U mg⁻¹ pada tahap dialisis. Peningkatan aktivitas spesifik ini menunjukkan bahwa pemurnian parsial enzim lipase dari bakteri isolat lokal LKMA₃ mampu meningkatkan kemurnian lipase menjadi 3,13 kali dibandingkan ekstrak kasar.

Daftar Pustaka:

- [1] Andaluema, B and Gessesse, A. 2012. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology*. 11(3): 100-118.
- [2] Telussa, I. 2013. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari *Coco Butter Substitute* dan Karakterisasi Lipasennya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura*. 10(1): 134-143.
- [3] Murni, S., Kholisoh, S., Renaldo, A., dan Arifin, N. 2011. Produksi Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* dengan Induser Minyak Goreng Sawit. *Jurnal Pengembangan Teknologi Kimia*. 21 (7): 88-94.
- [4] Dimitrijhvic, A. 2011. Production of Lipase From *Pseudozyma aphidis* and Determination of The Activity and Stability of The Crude Lipase Preparation in Polar Organic Solvent. *Journal of The Serbian Chemical Society*. 76(8): 1081-1092.
- [5] Septiani. 2019. Karakterisasi Lipase Termotabil (Isolat AL96) Berdasarkan Parameter Temperatur dan PH Pada Industri Makanan. *Lantanida Jurnal*. 7(1): 49-63.
- [6] Purwanto dan Maria Goretti. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible. *Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi*. 7(2): 64-71.
- [7] Indriyani, D. 2020. *Produksi dan Karakterisasi Enzim Lipase Mesofilik dari Bakteri Lipolitik Isolat Asal Pengomposan Limbah Domestik*. Tesis. FMIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- [8] Khasanah, K. 2017. *Modifikasi Kimia Enzim Protease dari Rhizopus oligosporus Menggunakan Sitrakonat Anhidrida*. Skripsi. FMIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- [9] Su'i, M and Suprihana. 2013. Lipase Fractionation of Coconut Endosperm by Salting Out Method. *Agritech Journal*. 33(4): 377-383.
- [10] Nopiani., Yandri, A. S., dan Hadi, S. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase Dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Dengan Amobilisasi Menggunakan Bentonit. *Jurnal Analis Kesehatan*. 5(1): 504-510.
- [11] Selvia, R., Wuryanti dan Sriatun. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 17(2): 51-57.
- [12] Wardani, A dan Nindita, L. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Hasil Isolasi dari Whey Tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 13(3): 149-156.
- [13] Shinde, S and Sony, R. 2014. Production and Partial Purification of α -Amylase From *Bacillus sp.* *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 5(1): 57-62.